

DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-237-244

УДК 616.33- 57.086.83

## ВОЗМОЖНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЖЕЛУДКА

*О.В. Перетяцько, В.Д. Беленюк, О.Л. Москаленко*

*Культивирование клеток слизистой оболочки желудка является достаточно затруднительным. Однако, возможности использования эпителиоцитов в качестве моделей для исследований in vivo достаточно перспективны.*

**Цель.** *Получить первичную культуру клеток слизистой оболочки желудка и оценить её фенотипические и метаболические характеристики.*

**Материалы и методы.** *В данной работе представлены результаты методического исследования по получению первичных клеточных культур слизистой оболочки желудка человека методом ступенчатого протеолиза и возможности их дальнейшего культивирования. Для оценки фенотипа полученных клеток и их жизнеспособности использовался метод многоцветной проточной цитометрии.*

**Результаты исследования.** *Были выделены гетерогенные клетки слизистой оболочки желудка с высоким процентом жизнеспособности. В ходе культивирования количество жизнеспособных клеток снижалось незначительно.*

**Заключение.** *Нами была получена первичная жизнеспособная культура эпителиоцитов желудка, что позволяет заключить, что представленная методика выделения пригодна для получения жизнеспособных клеток.*

**Ключевые слова:** *первичная культура клеток; эпителиоциты желудка; культивирование клеток*

**Для цитирования.** *Перетяцько О.В., Беленюк В.Д., Москаленко О.Л. Возможности выделения и культивирования эпителиоцитов желудка // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2021. Т. 13, № 2. С. 237-244. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-237-244*

## POSSIBILITIES OF ISOLATION AND CULTIVATION OF GASTRIC EPITHELIAL CELLS

*O.V. Peretyat'ko, V.D. Belenyuk, O.L. Moskalenko*

*Cultivation of cells of the gastric mucosa is quite difficult. However, the possibility of using epithelial cells as models for in vivo studies is quite promising.*

**The purpose.** *To obtain a primary culture of gastric mucosa cells and evaluate its phenotypic and metabolic characteristics.*

**Materials and methods.** *This paper presents the results of a methodological study on obtaining primary cell cultures of the human gastric mucosa by step-by-step proteolysis and the possibility of their further cultivation. Multicolour flow cytometry was used to evaluate the phenotype of the obtained cells and their viability.*

**Research result.** *We were isolated heterogeneous cells of the gastric mucosa with a high percentage of viability. During cultivation, the number of viable cells decreased slightly.*

**Conclusion.** *We obtained a primary viable culture of gastric epithelial cells, which allows us to conclude that the presented method of isolation is suitable for obtaining viable cells.*

**Keywords:** *primary cell culture; epithelial cells of the stomach; cultivation of cells*

**For citation.** *Peretyat'ko O.V., Belenyuk V.D., Moskalenko O.L. Possibilities of Isolation and Cultivation of Gastric Epithelial Cells. Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 237-244. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-237-244*

Клетки эпителия обуславливают основную функциональную роль многих тканей в организме. Пространственное расположение эпителиальной ткани подразумевает выполнение в первую очередь барьерной, обменных и секреторных функций. В связи с этим, данные клетки привлекают внимание многих исследователей, в особенности в последнее время. Имея повышенный индекс пролиферации и дифференцировки, эпителиоциты являются достаточно популярными моделями среди клеточных культур [1, с. 791]. Эпителиальные клетки тесно связаны между собой *in vivo* и очень хорошо подходят для монослойных клеточных культур.

Исследование эпителиоцитов желудка культуральным методом ведется достаточно давно. Так, сообщалось о нескольких методах выделения эпителиоцитов у животных для последующего культивирования [2, с. 135-141]. Клетки слизистой оболочки желудка хорошо подходят для исследований *in vitro* в оценке метаболизма, взаимодействия с окружающей средой, фармакологического воздействия, реконструктивной биоинженерии и т.д.

На сегодняшний день отсутствует клеточная линия нормальных и раковых эпителиоцитов слизистой оболочки желудка, в связи с чем, изучение данных клеток опирается в основном на выделение первичных клеточных культур. Однако, выделение и культивирование клеток слизистой оболочки желудка, в частности у человека, остается весьма затруднительным [3,

с. 12-15]. Особую роль в культивировании первичных эпителиоцитов желудка играет выделение одиночных клеток с наибольшим пролиферативным потенциалом [4, с. 71-85]. Для достижения данного обстоятельства, некоторыми исследователями предложена методика мягкого ферментативного переваривания тканевого биоптата [5, с. 115-121].

**Цель работы:** Получить первичную культуру клеток слизистой оболочки желудка и оценить её фенотипические и метаболические характеристики.

### **Материалы и методы**

Забор биологического материала производился на базе лечебно-диагностического отделения НИИ МПС. Обследовались пациенты в возрасте 30–60 лет (средний возраст пациентов составил 46 лет). Из исследования были исключены пациенты, с онкологическими заболеваниями, диагностированными респираторными заболеваниями, а также эндоскопическими патологиями и признаками инфицирования *H. pilory*. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

В ходе фиброгастроуденоскопического метода обследования в асептических условиях у 3 пациентов производился забор биоптатов слизистой оболочки желудка. Отобранные образцы немедленно погружались в пробирку типа эппендорф с транспортной средой на основе RPMI-1640. Время от забора биоптата до момента начала выделения не превышало 1,5 часов. На первом этапе образцы тщательно измельчались после чего трижды отмывались при 100 г в течение 3 мин в среде RPMI 1640 с гентамицином в концентрации 10 мкг/мл. После приступали к избирательному ферментативному протеолизу тканей, для этого к образцу добавляли коллагеназу II типа в расчете 30 Ед/мл и помещали в термостат при 37<sup>0</sup>С с постоянным перемешиванием на 10 минут. После образец тщательно ресуспендировался и осаждался в течение 5 мин. при 200 г и 4<sup>0</sup>С. Супернатант отбирался в отдельную пробирку. Осадок подвергался повторному протеолизу по описанной схеме. Цикл повторялся 7-8 раз до полного протеолиза гастробиоптата. Слитые супернатанты трижды отмывались раствором PBS pH 7,4. Полученный материал ресуспендировался в первичной культуральной среде (ПКС) на основе RPMI 1640 с добавлением

гентамицина 10 мкг/мл и 8% фетальной бычьей сыворотки. В дальнейшем, клетки помещались в культуральные планшеты из расчета  $1,5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> и помещались в CO<sub>2</sub> инкубатор при 37°C на 24 часа. По прошествии суток, планшеты промывались подогретым раствором PBS pH 7,4. После чего, добавлялась обновлённая ПКС и вновь помещалась в CO<sub>2</sub> инкубатор 37°C еще на 48 часов. По прошествии инкубации клетки снимались с поверхности планшетов раствором Версена при 4°C, трижды отмывались раствором PBS pH 7,4 и подсчитывались в камере Горяева.

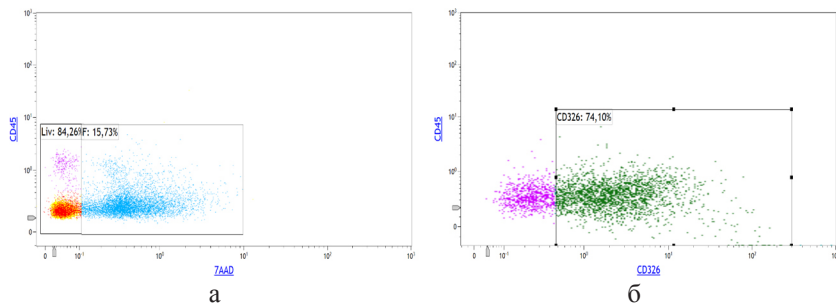
Полученные культуры клеток анализировались методом проточной цитометрии с использованием прямой трехцветной иммунофлуоресценции и применением моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Использовали следующие антитела: CD326-FITC, 7AAD-PC5, CD45-APC7. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 20000 клеток. Дальнейший анализ данных производился в пакете программ Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, USA).

### Результаты и обсуждение

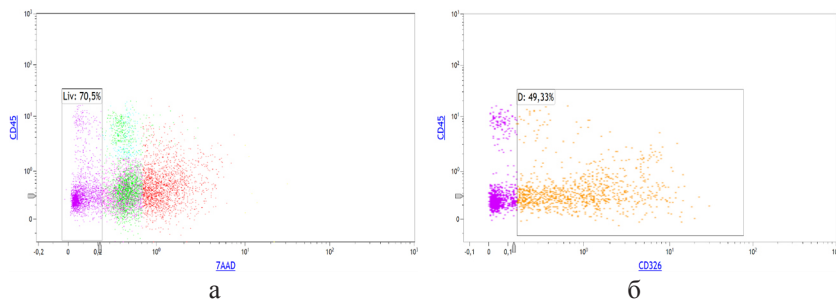
В ходе нашего исследования были получены гетерогенные популяции эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка, в количестве обеспечивающим пролиферативный ответ в контролируемых условиях *in vitro*. Было показано, что после этапа выделения по описанной технологии процент живых клеток составил 80-95% (в среднем 92,6%), что, учитывая сложности выделения и культивирования клеток слизистой оболочки желудка, считается высокими показателями (Рис. 1 – а). В рамках пула живых клеток было проведено исследование процента эпителиальных клеток на основе флуоресценции CD326. В результате было выявлено, что на момент выделения процент данных клеток составляет 65-80% (в среднем 72,3%) (Рис.1 – б). Процент клеток, несущих панлейкоцитарный маркер CD45, не превышал 0,5-2,2% (в среднем 0,8%), что указывает на практически полное отсутствие в просвете прилегающих к слою слизистой ткани капилляров иммунологических клеток.

По прошествии 72 часовой инкубации клеток в контролируемых условиях *in vitro*, было показано, что процент живых клеток составил 63-76% (в среднем 70,6%), что, указывает на постепенную гибель некоторых популяций клеток, полученных в процессе выделения (Рис.2 – а). В тоже время нужно помнить, что при избытке в ПКС продуктов клеточного рас-

пада, высока вероятность запуска процессов массовой клеточной гибели, как следствие становится крайне важен постоянный мониторинг за состоянием культуры.



**Рис. 1.** а – гейтирование на основе соотношения 7AAD и CD45, определяющее процент живых клеток; б – гейтирование на основе соотношения CD326 и CD45, определяющее процентное содержание клеток, несущих эпителиальный маркер CD326



**Рис. 2.** а – гейтирование на основе соотношения 7AAD и CD45, определяющее процент живых клеток; б- гейтирование на основе соотношения CD326 и CD45, определяющее процентное содержание клеток, несущих эпителиальный маркер CD326

В рамках пула живых клеток было проведено исследования процента эпителиальных клеток на основе флюоресценции CD326, в результате было выявлено, что к 72 часам процент данных клеток снизился до 40-55% (в среднем 47,5%), что, указывает на снижение количества рецепторов к CD326 представленных на поверхности клеточной мембраны (Рис.2 – б). Данный процесс можно объяснить изменением метаболических процессов в клетке на фоне длительной инкубации в условиях отсутствия в ПКС специфического цитокинового микроокружения. Процент клеток, несущих

щих панлейкоцитарный маркер CD45, так же снизился и достиг 0,2-0,7% (в среднем 0,4%), данная картина вызвана особенностями формирования эпителиальными клетками монослоя на дне культуральных планшетов и возникающей на этом фоне конкуренцией. При инкубации сверх 1,5-2 недель в контролируемых условиях *in vitro* должна сформироваться монокультура клеток, составляющих превалирующую популяцию.

### **Заключение**

По результатам исследования было доказано, что, несмотря на имеющиеся трудности в плане выделения и длительного культивирования клеток слизистой оболочки желудка, постепенное формирование обобщенной монокультуры вполне возможно. Приведенная процедура многократного протеолиза гастробиоптата, показала свою пригодность для получения жизнеспособных клеток слизистого слоя. В тоже время, при должном контроле процессов пролиферации выделенных клеток с применением методов микроскопии и проточной цитометрии, становится возможно своевременно реагировать на изменение процессов, протекающих в культуре исследуемых клеток. Было показано, что при наличии в культуре, большого количества клеток иммунной системы, повышается риск апоптотических реакций и как следствие гибели всей линии. Таким образом, важным аспектом становится амортизация методов изоляции клеточного материала из гастробиоптатов, а также подбор условий для инкубации клеток *in vitro*, при которых станет возможно в кратчайшие сроки сформировать монокультуру клеток, что в свою очередь позволит повысить эффективность пролиферативного ответа целевой популяции.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Информация о спонсорстве.** Участие в прохождении стажировки «Методы культивирования и анализа клеточных культур» проведено при поддержке Красноярского краевого фонда науки.

### **Список литературы**

1. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: Лаборатория знаний, 2018. 791 с.
2. Kinoshita Y., Hassan S., Nakata H., Asahara M., Matsushima Y., Kawanami C., Ping C.Y., Min D., Nakamura A., Chiba T. Establishment of primary epitheli-

- al cell culture from elutriated rat gastric mucosal cells // *J Gastroenterol.*, 1995, vol. 30, no. 2, pp. 135-41. <https://doi.org/10.1007/bf02348656>
3. Moyer M.P. Culture of human gastrointestinal epithelial cells // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1983, vol. 174, no. 1, pp. 12-15. <https://doi.org/10.3181/00379727-174-1-rc1>
  4. Kedinger M., Haffen K., Simon-Assmann P. Intestinal tissue and cell cultures // *Differentiation*, 1987, vol. 36, no. 1, pp. 71-85. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1987.tb00182.x>
  5. Qin J., Pei X. Isolation of Human Gastric Epithelial Cells from Gastric Surgical Tissue and Gastric Biopsies for Primary Culture // In: Baratta M. (eds) *Epithelial Cell Culture. Methods in Molecular Biology*, 2018, vol. 1817. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8600-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8600-2_12)

### References

1. Freshny R.Ya. *Kul'tura zhivotnykh kletok: prakticheskoe rukovodstvo* [Animal cell culture: a practical guide]. M.: Laboratory of Knowledge, 2018. 791 p.
2. Kinoshita Y., Hassan S., Nakata H., Asahara M., Matsushima Y., Kawanami C., Ping C.Y., Min D., Nakamura A., Chiba T. Establishment of primary epithelial cell culture from elutriated rat gastric mucosal cells. *J Gastroenterol.*, 1995, vol. 30, no. 2, pp. 135-41. <https://doi.org/10.1007/bf02348656>
3. Moyer M.P. Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1983, vol. 174, no. 1, pp. 12-15. <https://doi.org/10.3181/00379727-174-1-rc1>
4. Kedinger M., Haffen K., Simon-Assmann P. Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation*, 1987, vol. 36, no. 1, pp. 71-85. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1987.tb00182.x>
5. Qin J., Pei X. Isolation of Human Gastric Epithelial Cells from Gastric Surgical Tissue and Gastric Biopsies for Primary Culture. In: Baratta M. (eds) *Epithelial Cell Culture. Methods in Molecular Biology*, 2018, vol. 1817. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8600-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8600-2_12)

### ДАнные ОБ АВТОРАХ

**Перетьяко Ольга Викторовна**, научный сотрудник, канд. биол. наук  
*Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера  
ФИЦ КНЦ СО РАН*  
ул. Партизана Железняка, 3г, г. Красноярск, 660022, Российская  
Федерация  
[peretyatko Olga@mail.ru](mailto:peretyatko Olga@mail.ru)

**Беленюк Василий Дмитриевич**, младший научный сотрудник

*Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера  
ФИЦ КНЦ СО РАН*

*ул. Партизана Железняка, 3г, г. Красноярск, 660022, Российская  
Федерация  
dyh.88@mail.ru*

**Москаленко Ольга Леонидовна**, старший научный сотрудник, канд.  
биол. наук

*Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера  
ФИЦ КНЦ СО РАН*

*ул. Партизана Железняка, 3г, г. Красноярск, 660022, Российская  
Федерация  
gre-ll@mail.ru*

#### DATA ABOUT THE AUTHORS

**Olga V. Peretyat'ko**, Research Fellow, Cand. Sc. (Biology)

*Scientific Research Institute for Medical Problems of the North  
FRC KSC SB RAS*

*3g, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation  
peretyatkooolga@mail.ru*

*ORCID: 0000-0003-1142-3933*

*SPIN-code: 3723-2874*

**Vasiliy D. Belenyuk**, Research Assistant

*Scientific Research Institute for Medical Problems of the North  
FRC KSC SB RAS*

*3g, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation  
dyh.88@mail.ru*

*ORCID: 0000-0003-2848-0846*

*SPIN-code: 6195-6630*

**Olga L. Moskalenko**, Senior Researcher, Cand. Sc. (Biology)

*Scientific Research Institute for Medical Problems of the North  
FRC KSC SB RAS*

*3g, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation  
gre-ll@mail.ru*

*ORCID: 0000-0003-4268-6568*

*SPIN-code: 9730-6265*